

Myosin 並びに Actomyosin の酵素化学的研究*

— 各種イオン環境下における Actin の影響 —

湯田坂 八重子

札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

Studies on Enzymatic Properties of Myosin and Actomyosin

— The Effect of Actin on ATPase Activity in the Presence of Various Kinds of Ions —

By

YAEKO YUTASAKA

Department of Physiology, Sapporo University of Medicine
(Chief: Prof. T. NAGAI)

筋肉の収縮性蛋白質である myosin, actin に関しては Engelhardt¹⁾ の myosin-ATPase 発見以来, 今日まで幾多の研究者によつて蛋白質化学のあらゆる分野にわたつて研究され, ことに酵素化学的な分析についてはもはや余すところなく論議しつくされたかのごとき観がある。

しかしながら一方生体にとつて最も本質的かつ重要な問題である筋収縮と ATP 分解の関連については A. Szent-Györgyi^{2), 3)}, H. H. Weber⁴⁾, Mommaerts⁵⁾, etc. の廣汎な研究にもかかわらず未だ意見の一致を見ず未解決のまま残されている現状である。

また酵素化学的な研究においても従来, 筋肉の構造蛋白で同時に ATPase として作用する myosin に重点がおかれているが, 同様に収縮性蛋白として存在する actin の影響については myosin-ATPase の特性をある程度修飾する二, 三の事実が報告されているに過ぎない。

われわれはこの点に着目して純粋に抽出精製した actin と myosin を用いてこの方面の検索を行い, 試験管内における筋収縮モデルといわれる superprecipitation⁶⁾ との対応の下に筋収縮機構解明への一つの key point たらしむべく以下述べるごとき実験を行つた。

実験方法

A. 実験材料: 家兎筋肉より actin は Straub 氏法により, myosin 及び ATP は A. Szent-Györgyi 氏法²⁾ により抽出した。

1) myosin 溶液: 14 mg/cc 0.3 M-KCl 溶液 (但し低塩濃度における実験には 0°C で一夜透析したものをを用いた。)

2) actin 溶液: 7 mg/cc 0.4% NaHCO₃ 溶液

3) ATP 溶液: 7.8×10^{-3} M (0.464 mg/cc 水解 p) Ba-塩を Na-塩に置換して用いた。

4) MgCl₂, CaCl₂: 5×10^{-2} M

5) Buffer 溶液: Michaelis 氏 Veronal-acetate buffer 溶液 pH 6.5 のものをを用いた。pH は H. M-3 型ガラス電極で測定した。蛋白濃度は Micro-Kjeldahl 法で

* 本論文の要旨は第 31 回北海道医学会において発表した。なお本研究費の一部は北海道総合開発局よりの科学研究費補助金によつた。ここに深甚の謝意を表する。

1) Engelhardt, V. A. & Ljubimova, M. N.: Nature 144, 688 (1939).

2), 3) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Con-

traction, 1 st. ed. (1947); 2 nd. ed. (1951).

4) Weber, H. H. & Portzehl, H.: Advances in Protein-Chemistry 7 (1952).

5) Mommaerts, W. F. H. M.: J. Gen. Physiol, 30, 5, 401 (1947).

6) Straub, F. B.: cit. 2)

factor 6.25 として測定した。

B. 方 法:

myosin: 14 mg/cc 溶液を 0.25 cc (終濃度 2.3mg/cc)

actin: 7 mg/cc 溶液を 0.25 cc (終濃度 1.16 mg/cc)

ATP: 7.8×10^{-3} M 溶液を 0.25 cc (終濃度 1.3×10^{-3} M)

MgCl₂, CaCl₂: 5×10^{-2} M 溶液を 0.03 cc (終濃度 10^{-3} M)

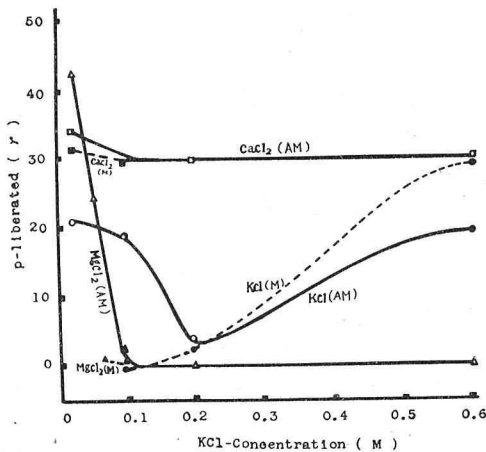
Buffer 液: Veronal-acetate buffer 溶液 (pH: 6.5) を 0.5 cc

[KCl]: 0.02~0.6 M の間を変化させた。

上記組成の反応液 (全量 1.5 cc) を 20°C で 5' 温浴しトリクロール醋酸 3.5 cc (終濃度 5%) を加えて反応を止め、濾過し、濾液 1 cc についてその含有する遊離 p を Bodansky 法⁷⁾で呈色せしめ、Pulfrich-Stufen-Photometer で filter S-72, 液層 1 cm において比色定量した。

実験成績

上記の方法で実験を行い、下図に示す如き成績を得た。



Myosin : 2.3 mg./cc, Actin : 1.16 mg./cc.
ATP : 1.3×10^{-3} M, MgCl₂ and CaCl₂: 10^{-3} M,
pH : 6.5 (Veronal-acetate buffer),
Temperature : 20°C, Time : 5',
●---● Myosin } without MgCl₂ and CaCl₂
○---○ Actomyosin }
▲---▲ Myosin } with MgCl₂
△---△ Actomyosin }
■---■ Myosin } with CaCl₂
□---□ Actomyosin }

上図に示した成績を各イオンの種類別に括めると次のよ

うになる。

1) K⁺: myosin-ATPase は 0.6 M-KCl で活性度最大, 0.1 M 以下では殆ど活性度が見られないのに反し, actomyosin の ATPase では 0.2 M に一つの谷を印し, それより高い [KCl] では myosin-ATPase と同様な, しかしこれより低い活性度を示すが 0.2 M 以下では [KCl] 減少とともに活性度は上昇した。

2) Mg⁺⁺: myosin-ATPase では [KCl] と無関係に強く抑制されるが, AM では低 [KCl] (0.05 M 以下) で急激に活性に轉じ 0.02 M では Ca⁺⁺ の促進効果を遙に上廻る結果を示した。

3) Ca⁺⁺: M, AM とも [KCl] と無関係に full に賦活している。

総括並びに考按

上記成績に基づいて二, 三の考察を試みる。

A) 各種イオンの環境下における myosin-ATPase に対する actin の影響

従来漠然といわれているいわゆる ATPase は myosin-ATPase の有するそれであるが, myosin は actin と結合することによつて種々異なる態度をとることが知られ (Sarkar, A. G. Szent-Györgyi, Banga⁹⁾ W. Hasselbach¹⁰⁾) も ATPase に対するイオンの影響について, 従来文献に見る如き矛盾がこの点にあることを指摘している。

われわれの実験においても myosin-ATPase と actomyosin のそれとは量的, 質的に明かに態度を異にすることを認めた。

以下各種イオンの効果について論じてみることにする。

1) K⁺: われわれの成績では前述の如く, K⁺ 存在下の ATPase 活性度は myosin は 0.6 M に一つの optimum を有するが actomyosin では 0.2 M を境として両端に二つの optima を有し且つ高塩濃度では myosin-ATPase 活性度よりも低く, 低塩濃度では逆に非常に高い活性度を示した。

従来 ATPase に対する [KCl] の影響は多くの研究者によつて見られている。即ち Perry¹¹⁾ 渡辺等¹²⁾ は 0.1 M に, A. Szent-Györgyi¹³⁾, Banga¹⁴⁾ は 0.2 M に, Mommaerts⁵⁾ は 0.3 M にそれぞれ optimum, を見出している。

このように先人の場合は成績に多少の差こそあれ, actomyosin

7) Bodansky, O.: J. Biol. Chem. 99, 197 (1932); J. Biol. Chem. 101, 93 (1933).
8) Sarkar, N. K. & Szent-Györgyi, A. G.: Enzymologia 14, 4, 267 (1950).
9) Banga, I.: cit. 3).
10) Hasselbach, W.: Z. Naturforsch. 7, b, 183 (1953). cit.) Berichte 157, 177 (1953).

11) Perry, S. V.: Biochem. J. 48, 3 (1951); J. Biochem. 40, 4, 387 (1953).
12) 渡辺, 殿村: J. Biochem. 40, 4, 387 (1953).
13) Szent-Györgyi, A.: Acta Physiol. Scand. 9, suppl. 25 (1945) (cit. 5).
14) Banga, I.: Studies Inst. Med. Chem., Univ. Szeged, 3, 64 (1943); 1, 27 (1942) (cit. 5).

myosin の結合、解離とは無関係にほぼ $[KCl]$ 0.1~0.3 M に optimum を有し、それより $[KCl]$ 増加と共に活性度の減少を來す連続的な curve を示し myosin-ATPase と actomyosin のそれとの間に質的な差は見られずただ量的な差があるだけである²⁰⁾。しかもこの量的な差もわれわれの場合とは反対に 0.6 M-KCl 下では actomyosin の示す ATPase 活性度は myosin-ATPase のそれよりも高い。

われわれの成績はかかる先人の業績とは全く異なつた結果を示している。このように actomyosin の ATPase が $[KCl]$ 0.2 M を境として特異的な curve を描いたことは actomyosin の結合、解離、及び superprecipitation 等と考合せて、非常に興味深い。

2) Ca^{++} : 上述の如くわれわれの結果では ATPase 活性度としては myosin, actomyosin と大差がないがこれを Ca^{++} 賦活の点から見れば $[KCl]$ 0.2 M 以下では myosin-ATPase に対する促進は actomyosin のそれよりも遙に強い。また他のイオンの場合と異なり $[KCl]$ 変化による影響が見られない。かかる成績は先人のそれとは異なるものである。即ち従来 myosin 及び actomyosin の ATPase に対する Ca^{++} の促進効果はすべての研究者の等しく認めているところで $[KCl]$ 変化による optimum は 0.1 M 附近の低塩濃度に認める者が多く (Perry¹¹⁾, Mommaerts⁹⁾) 両 ATPase に本質的な差がないというところに一致点が見られるようである。このようにわれわれの成績は先人の報告とは異なるもので、ただ Biro, Szent-Györgyi¹⁵⁾ が actomyosin の ATPase は 0.1 M-KCl 以下では僅かしか促進しないといつているのと類似しているだけである。この結果は actin : myosin の量的な関係が重要な因子となつてゐるためではなからうか。即ち、われわれの合成 actomyosin が stoichiometric に actin と結合する myosin 以外に過剰な myosin を含むか、或いは 0.2 M-KCl 以下でも完全に結合せず一部解離状態で存在したとすれば上図の Ca^{++} 存在下の actomyosin ATPase 活性度は余剰の myosin-ATPase と actomyosin のそれとの和として現われたわけで、その結果 actomyosin, myosin と大差なき曲線を示したのではなからうか。この点は本実験と同条件下で superprecipitation を起さしめ、或いは pH を変化することによつて actomyosin と myosin を分離し、それ等について Ca^{++} の効果を見ることによつて証明されよう。

また Perry¹¹⁾, Mommaerts⁹⁾ によつて指摘されているように K^+ と Ca^{++} の拮抗作用を考慮に入れば、

われわれのかかる $[KCl]$ と無関係な Ca^{++} 賦活を説明づける一つの手掛が興えられると考える。

3) Mg^{++} : Mg^{++} については上記の如く低塩濃度における actomyosin の場合にのみ強い賦活を示した。この結果は従來の文献との唯一の一致点で、先人の多くの報告^{2), 3), 9), 12)} もこの点に関してだけは一致を見ている。また渡辺等¹²⁾は Mg^{++} 効果に対する $[KCl]$ の影響を詳細に検討しているが、われわれの結果は彼等の場合とも良く一致している。

このように myosin-ATPase の強い inhibitor である Mg^{++} が, actomyosin の ATPase の場合にのみ 0.1 M-KCl 以下のいわゆる superprecipitation を起す範囲で強い促進効果に轉ずる現象は興味ある事実であらう。

以上述べたごとく、 Mg^{++} の効果を除いて、われわれの成績が先人のそれに一致しないのは如何なる理由によるものであらうか。これには種々の條件の差が考えられるが、その主なものとしてわれわれは次のごとき点を考へている。

1) 標本の差

a) 標本の純粋性: われわれが実験材料として用いた蛋白質は純粹に抽出、精製した myosin と actin であるが、他の研究者の場合はその殆どが、洗滌 myosin-B である。従つて特に精製、純化したものを除いては、反應系に種々の夾雜物の混入が考えられるので、これ等とわれわれの場合とを同一に論ずる訳には行かない。

b) hysteresis の存在: actomyosin の ATPase が上述の如き特異的な曲線を描いたことに対しては hysteresis がその原因の一つとして考えられる。

A. G. Szent-Györgyi¹⁶⁾ によれば筋肉の水洗、glycerin 処理、actomyosin 系の長時間保存等によつて actin と myosin の結合が強化され、いわゆる hysteresis なる現象が起きるとされている。これについては永井等¹⁷⁾ が詳細なる考察を述べているが、hysteresis は actomyosin 結合、解離の KCl 特異性を減少せしめるといふ。しかし上記 myosin-B にはその標本作製上の性質からして当然この hysteresis の存在が考えられる。しかるにわれわれの actomyosin は結晶 myosin と actin による合成 actomyosin であるために hysteresis は存在せず、従つて actin, myosin の結合、解離が容易、且つ判然と現われ、その結果上記の如き曲線を描いたのではなからうか。

2) actin の影響、及び actin : myosin の量的関係

上述の如きわれわれの成績からすれば、actin の存在は

15) Szent-Györgyi, A. & Biro, N. A.: cit. 8).

16) Szent-Györgyi, A. G.: Enzymologia 14, 4, 246 (1950).

17) 永井・宮崎: 札幌医誌 4, 232 (1953).

myosin-ATPase に対して条件如何によつて抑制或いは促進と逆方向に作用するもののように思われる。このことを 0.2 M-KCl を境として高塩濃度と低塩濃度とに分けて考えてみる。

先ず高塩濃度において、われわれの成績では常に myosin-ATPase の方が actomyosin のそれよりも高い活性度を示した。Mommaerts⁵⁾ はこれと全く反対の成績を得ているが、彼の場合は myosin-B と myosin を用いた実験で、その活性度の絶対値は比較出来ない。何となれば myosin-B 中に含まれている myosin の定量は今日なお不可能だからである。しかればわれわれの成績において、0.6 M-KCl 中で起る actomyosin の解離によつて myosin が free となるにかかわらずその ATPase 活性度が低い原因は何によるものであろうか。これをわれわれは介在する actin の影響と考えた。

しかしわれわれの場合は合成 actomyosin を用いたため、過剰の myosin の存在が予想される。かかる場合に、actin による抑制効果を補つて余りある myosin-ATPase の活性度が現われることは考えられることである。

しかるに渡辺等¹²⁾ の myosin-B を用いての実験では、actin と myosin とが stoichiometric に過不足なく結合しているとすれば ATP 添加によつて解離した myosin-ATPase は大部分が actin によつて抑制を受けるため、0.6 M-KCl 下では殆ど活性度が見られなかつたのであろう。

しかしながらここでわれわれは一つの大きな矛盾に遭遇する。即ちわれわれは 0.6 M-KCl 下では ATP 添加によつて起る actomyosin → actin + myosin なる従来の方³⁾に基づいて成績の解析を進めてきたのであるが、原則的に考えて、解離した actin が阻害作用を行うことは考えられない事実で、このことからすれば上記の解離式は首肯出来ないことになる。

しかしながらこの阻害作用は actin 自体によるものか、或いは actin に吸着されたなん等かの物質によるものか、更にはまた actin の介在によつて惹起された二次的因子によるものか、等について、にわかに結論は下し難く、この点は今後の詳細な検討に俟ちたいと考えている。

次に 0.2 M-KCl 以下において myosin-ATPase の活性度が見られないのに反し、これに actin を加えると強い活性に轉じていることは従来全く見られなかつた事実で、われわれはこれを actin が結合することによつて myosin-ATPase の性質に変化を來したものであると考えている。しかしながらこれも前記 0.6 M-KCl 下の actin の影響と同様、その作用機序は全く不明でこの点についても検

討を加えたいと考えている。

3) pH の影響

ATPase の pH optimum, は myosin は 6.5, 9 に actomyosin では 7 にあるといわれる³⁾⁻⁵⁾ しかし ATPase 活性度に対する [KCl] の影響に関する従来の実験条件において pH はまちまちである。このことも成績の統一を缺く一因となつたのではなからうか。この問題は両酵素の等電点との関連の下に目下研究中である。

以上 myosin, actomyosin の ATPase に対する各種イオンの影響は actomyosin の結合、解離、の問題を巡つて、その作用機序において種々疑問の点があるが、これ等は今後更に研究を重ねることによつて解明するつもりである。

B) superprecipitation と ATPase との関係

試験管内における筋収縮のモデルとして A. Szent-Györgyi¹³⁾ によつて提唱された superprecipitation は筋収縮機構解明への重要な key point の一つであるにもかかわらず、詳細な研究は行わなれておらず、定量法の不確実性と相俟つて幾多の疑問を残している。われわれはかかる見地から ATPase と superprecipitation とを比較してみた。

即ち上述の成績を葛西¹⁸⁾ の myosin-B を用いて行つた実験結果と比較したところほぼその傾向を一にしていることを認めた。即ち氏によれば、

① K⁺ のみでは 0.06 M-KCl で沈澱高最高

② Mg⁺⁺ 存在下では superprecipitation の範囲が狭まり、しかもその度合が強くなる。

③ Ca⁺⁺ 存在下では Super の発現する KCl 濃度範囲が廣く、その optimum は高濃度側へずれる。且つ superprecipitation の程度は抑制を受ける。

かくの如く、Ca⁺⁺ を除いては AM の ATPase と superprecipitation の態度とは酷似した結果を示している。

Ca⁺⁺ については一見 ATPase と平行しないようであるがこの点は目下検討中である。

しかしながら superprecipitation と ATPase の平行性は定量的に比較出来ぬところに隘路がある。例えば ATPase はかなり存在していても superprecipitation の起らぬことがあるが、反対の ATPase 無くして superprecipitation の起る例はまだ見出されていない。前者の場合 Ca⁺⁺ が一見類似しているように見える。最近 Turba et al¹⁹⁾ は或特定の条件では As が ATPase 無傷で superprecipitation を抑え、その研究から superprecipitation に伴う ATPase 以外の P 分解の存在を報告して注目をひいた。しかし麦倉²⁰⁾ はそのような結論の無理であることを実証している。なお、superprecipitation と ATPase の平行性は麦倉の実

18) 葛西：未発表。

19) Kuschinsky, G., Turba, F. & Kohler, I.: Experimenten-

tia 8, 1, 15 (1952).

20) 麦倉：未発表。

験においても認められている。

以上われわれは superprecipitation 及び ATPase に及ぼす種々の因子の中からイオンの影響だけをとり上げて両者を比較した。従つて本実験の結果から superprecipitation と ATP 分解とは筋収縮において同一段階に対応するものなりや、あるいはまた ATP 分解による energy がどの時期に用いられるかなど、生理学上最も本質的な問題に対してただちに結論を與えるものではないが、筋収縮の重要な因子の一つであるイオンの影響が、superprecipitation と ATPase において密接な平行性を有することは明かで、このことから収縮と ATP 分解に対して一つの示唆が與えられるものとする。すなわち superprecipitation が確実に筋収縮のモデルたりうるならば、われわれ及び表倉の結果は ATP 分解は筋肉の収縮期に対応するものであることを推測せしめる。このことは、弛緩期に ATP 分解が行われるという A. Szent-Györgyi²¹⁾ の説と矛盾し、永井²¹⁾ の収縮は active process なりとする見解を支持する。

以上の考えを総括した結果、われわれは今後

pH, 温度, 各種薬物の影響などについて研究し、さらに進んで AM の結合, 解離, actin の変形など残された幾多の問題を検討することによつて筋収縮機構における明確な関係を解明したいと考えている。

結 論

1) myosin-ATPase と actomyosin の ATPase とは量的, 質的に異なるものである。

2) superprecipitation と ATPase とはイオンの影響において密接な平行性を有する。

附 記 本論文の稿を了えて後 A. Szent-Györgyi²²⁾ によつて次のことがらが発表された。
すなわち

① 低温濃度下で pH 7 において myosin は ATPase 活性を示さないが、これに actin が加わると, full activity を得る。

② ATP 分解は収縮期に対応する。
これ等の事実は上述のわれわれの成績並びに見解を裏付けるものであると考える。

(昭和 28. 12. 21 受付)

Summary

We studied on the effect of actin on myosin-ATPase activity in the presence of various kinds of ions, and discussed relation between ATPase and superprecipitation.

Results are as follows:

- 1) Myosin-ATPase is different from ATPase of actomyosin quantitatively and qualitatively.
- 2) There is an intimate parallelism between ATPase activity and the grade of superprecipitation.

(Received Dec. 21, 1953)

21) 永井: 未発表.

22) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Con-

traction, 3rd. ed. (1953).